

تأثیر عصاره پانکراس بر تمایز سلول های ترشح کننده انسولین از سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش کوچک آزمایشگاهی

زهرا حاتم نیا^{۱*}، فریبا اسماعیلی^۱، فریبا هوشمند^۲، لیلا دهدهی^۱

^۱گروه زیست شناسی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ ^۲گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۲/۲/۲۲

تاریخ پذیرش: ۹۲/۹/۲۸

چکیده:

زمینه و هدف: با دیابت نوع یک در نتیجه ی تخریب خود ایمنی سلول های بتای جزایر پانکراس ایجاد می شود. مطالعات اخیر نشان می دهد بسیاری از انواع سلول های بنیادی می توانند به عنوان منابع احتمالی برای به دست آوردن سلول های قابل پیوند تولید کننده انسولین (IPCs) در نظر گرفته شوند. در این مطالعه تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به سلول های مولد انسولین با استفاده از عصاره پانکراس موش مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی آزمایشگاهی از سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش کوچک آزمایشگاهی برای تمایز به سلول های انسولین ساز استفاده شد. سلول های تمایز یافته با استفاده از رنگ اختصاصی دیتیزون و آنتی بادی های ضد انسولین- پروانسولین و ضد رسپتور بتای انسولین مورد ارزیابی قرار گرفتند. همچنین بیان ژن اختصاصی سلول های پانکراسی یعنی pdx-I در این سلول ها با روش RT-PCR بررسی شد.

یافته ها: سلول های تمایز یافته مشتق از روش مستقیم مورفولوژی مشابه با سلول های بتای پانکراس نشان دادند. سلول های دیتیزون مثبت به صورت دستجات قرمز ارغوانی دیده شدند. نتایج بررسی RT-PCR بیان ژن اختصاصی سلول های بتا (pdx-I) را در سلول های تمایز مستقیم نشان داد. ایمنوفلورسنس وجود نشانگرهای اختصاصی سلول های بتا را در این سلول ها به اثبات رساند.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان می توانند در حضور عصاره پانکراس به سلول های مولد انسولین تمایز یابند؛ لذا استفاده از این نتایج تولید سلول های بتا از سلول های بنیادی در شرایط آزمایشگاهی را تسهیل می کند.

واژه های کلیدی: سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان، عصاره ی پانکراس، تمایز، سلول های انسولین ساز، سلول های بتای پانکراس.

مقدمه:

از سلول های بنیادی (stem cells) مانند سلول های بنیادی بالغ و سلول های بنیادی جنینی که توانایی تمایز به سلول های بتا را دارند می تواند به عنوان روش درمانی جدیدی در نظر گرفته شود (۲). دو نوع سلول بنیادی در مغز استخوان وجود دارد، سلول های بنیادی خون ساز و سلول های بنیادی غیر خون ساز که سلول های بنیادی مزانشیم نامیده می شود. سلول های بنیادی مزانشیم (Mesenchymal Stem Cells= MSCs) تحت شرایط خاص به دودمان های سلولی ماهیچه،

دیابت نوع یک در نتیجه ی تخریب سلول های بتا توسط سلول های قاتل (killer cells) مشتق از لنفوسیت های T حاصل می شود (۱). البته تا به امروز روش درمانی قطعی وجود ندارد، تزریق انسولین و یا استفاده از داروهای خوراکی رایج است. استفاده از روش پیوند پانکراس و سلول های جزایر لانگرهانس به منظور درمان نیز استفاده می شود. به علت کمبود افراد اهدا کننده و به خصوص رشد روز افزون بیماری دیابت استفاده از این روش دچار محدودیت شده است. استفاده

روش بررسی:

در این مطالعه تجربی آزمایشگاهی از موش کوچک آزمایشگاهی نژاد balb/c استفاده شد. موش نر و موش بارد (در انتهای بارداری) از لانه ی حیوانات دانشگاه علوم پزشکی شهر کرد تهیه شد و مورد استفاده قرار گرفت. سلول های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان ران و ساق موش ۸-۴ هفته ای جدا شد. مغز استخوان نمونه ها با استفاده از محیط کشت Dulbecco's Modified Eagle Medium-Low-glucose (DMEM-LG) (Gibco) به همراه ۱٪ پنی سیلین (Sigma) و استرپتومایسین (Sigma) به وسیله ی سرنگ یک میلی لیتری تخلیه شد. مغز استخوان استخراج شده در دمای ۴ درجه ی سانتی گراد و ۲۵۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. رسوب سلولی حاصل با محیط کشت DMEM-LG محتوی ۱۵٪ سرم Fetal bovine serum (FBS) (Sigma) حل و به فلاسک های T₂₅ منتقل شد. محیط کشت هر دو روز یک بار با DMEM-LG محتوی ۱۵٪ سرم FBS تعویض شد. سلول ها در روز ۱۴-۱۰ با استفاده از تریسین ۲۵٪ و ethylenediamine (۱۰-۵ میلی مولار (Sigma) EDTA) tetra acetic acid (Sigma) واکشت شدند. رسوب سلولی حاصل با محیط کشت DMEM-LG محتوی ۱۵٪ سرم FBS به فلاسک های جدید و یا پلیت های شش خانه ای حاوی لامل استریل منتقل و در شرایط دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و فشار ۵٪ CO₂ انکوباتور نگهداری شد.

به منظور تهیه عصاره پانکراس، پانکراس نوزاد یک هفته ای موش کوچک آزمایشگاهی جدا و با PBS شستشو داده شد. بافت پانکراس در هموژنایزر محتوی ۹۹۰ میکرو لیتر PBS و ۱۰ میکرو لیتر مهارکننده ی پروتئاز (Phenyl methyl sulfonyl fluoride) (Sigma) همگن شد. محلول حاصل در دمای ۴ درجه سانتی گراد و ۳۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه و ۱۲۰۰۰ rpm و به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد. محلول رویی جدا و رسوب دور ریخته شد. برای تعیین غلظت پروتئین

استخوان، چربی و غضروف تمایز می یابد. سلول های بنیادی مزانشیم توانایی بازآرایی و ترمیم و همچنین اثرات سرکوب کننده ی ایمنی که می تواند در پیوند به میزبان مفید باشد (۳). اخیراً گزارش شده است که سلول های مزانشیمی مغز استخوان چوندگان توانایی و ظرفیت تولید سلول های انسولین ساز را در محیط in vitro دارند (۴). فاکتورهای مختلفی بر تمایز سلول های بنیادی اثر می گذارد. در طی مراحل نمو پانکراس، پیام های سلولی تمایز این اندام را کنترل می کنند (۵). پانکراس در حال تکوین فاکتورهایی تولید می کند که باعث تمایز سلول های بنیادی به سمت سلول های تولیدکننده ی انسولین می شود. از جمله این فاکتورها، فاکتور شبه انسولینی-۲ (Insulin Like growth Factor II= IGFII)، فاکتور رشد عصب (Neural growth Factor= NGF)، فاکتور رشد فیرو بلاستی (Fibroblastic growth Factor=FGF)، اکتیوین A و رتینوئیک اسید است که می توانند به تمایز سلول های بنای پانکراس کمک نمایند (۶). در طی تکوین و اندام زائی بدن، آندودرم جلویی که برای تشکیل جوانه ی پانکراس اختصاصی شده است شروع به بیان فاکتور رونویسی pdx-I می کند. جوانه های پشته و شکمی که از زائده ی اطراف روده جلویی حاصل شده اند دچار درون روی شده و اشعابات اپی تلیوم آن ها تکثیر یافته و وارد مزانشیمی که آن ها را احاطه کرده است می شوند، سلول هایی که اطراف مزانشیم هستند با دریافت پیام هایی از مزانشیم دچار تمایز می شوند. سلول هایی که pdx-I بیان می کنند و تحت القای پیام های دریافتی از مزانشیم هستند به سلول های بتا تمایز پیدا می کنند (۷). با توجه به فاکتورهای القا کننده ی تکوین در بافت پانکراس، این پژوهش با هدف ارزیابی اثر القایی عصاره ی پانکراس گرفته شده از پانکراس در حال تکوین بر تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به سلول های تولید کننده انسولین (Insulin-producing cells= IPCs) انجام شده است.

موجود در عصاره از روش بردفورد (Sigma) استفاده شد. عصاره تا زمان استفاده در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد (۸).

برای تمایز سلول های بنیادی مزانشیم مغز استخوان، سلول های واگشت دوم به صورت تک لایه با محیط کشت DMEM-LG، ۳٪ سرم FBS و ۱٪ آنتی بیوتیک در انکوباتور کشت داده شدند. پس از رسیدن سلول ها به تراکم سلولی مناسب به مدت شش تا ده روز به محیط کشت عصاره پانکراس اضافه و محیط محتوی عصاره هر دو روز یکبار تعویض شد. برای تمایز با روش انتخاب سلول های نستین مثبت از محیط کشت DMEM/F₁₂ بدون سرم استفاده شد. در ابتدا برای جداسازی سلول های با پیش ساز نستین مثبت محیط کشت DMEM/F₁₂ محتوی ITSFn (medium serum free) به سلول ها اضافه شد. در این مرحله سلول های نستین مثبت باقی مانده و بقیه حذف شدند. سپس به منظور تحریک تکثیر سلولی افزودنی هایی مانند N₂ (Gibco)، B₂₇ (Gibco)، فاکتور رشد فیروبلاستی نوع b و فاکتور رشد اپیدرمی به محیط کشت اضافه شد. در انتها به منظور القای تمایز به این محیط عصاره پانکراس افزوده شد.

برای بررسی مورفولوژیک سلول های تمایز یافته از رنگ آمیزی دیتیزون (Dithizone) استفاده شد. ۵۰ میلی گرم دیتیزون (Merck) در ۵ میلی لیتر دی متیل سولفوکسید (Dimethyl sulphoxide) (Sigma) حل و به عنوان محلول استوک در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. در هنگام استفاده دیتیزون با غلظت نهایی ۱۰ میکرومولار به سلول ها اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در انکوباتور انکوبه شد. سلول هایی که در نتیجه ی این رنگ آمیزی به رنگ قرمز درآمدند سلول های تولید کننده ی انسولین بودند. پس از شستشو با Hank's balanced salt solution (HBSS) و افزودن محیط کشت تمایزی سلول ها به انکوباتور برگردانده شد. جهت شمارش سلول های تمایز یافته و سلول های تمایز

نیافته از لام نئوبار استفاده شد (۲۳). برای هر نمونه پنج بار شمارش تکرار شد. به این صورت که سلول های رنگ آمیزی شده تریپسینه و بعد از سانتریفوژ با استفاده از لام نئوبار و میکروسکوپ نوری برای شمارش مشاهده شدند. اعداد حاصله با استفاده از آزمون Chi-square تجزیه و تحلیل و نتایج آن ارائه شد.

برای تشخیص وجود نشانگرهای سلول های بتا در سلول های تمایز یافته از روش ایمnofلورسنس استفاده شد. سلول های تمایز یافته پس از دو بار شستشو با PBS سلول ها با پارافرمالدئید ۴٪ به مدت ۲۰ دقیقه در محیط آزمایشگاه تثبیت شدند. افزایش نفوذ پذیری با تریتون X-100 ۳٪ و سرم بز نرمال ۱۰٪ به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور انجام شد. سپس با PBS دو بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه شستشو شد. پس از آن سلول ها با آنتی بادی اولیه ی ضد انسولین - پروانسولین (Sigma) و یا آنتی بادی اولیه ی ضد رسپتور بتای انسولین (Sigma) به مدت دو ساعت انکوبه شدند. آنتی بادی IgG ضد موشی متصل به fluorescence isothiocyanate (FITC) که در بز تهیه شده بود به عنوان آنتی بادی ثانویه (Sigma) به کار گرفته شد. سپس نمونه ها با گلیسرول ۷۰٪ (Acros) چسبانده، با لاک ناخن عایق و با کمک میکروسکوپ فلورسنس بررسی شد (۲۳).

به منظور بررسی بیان ژن اختصاصی سلول های انسولین ساز یعنی pdx-I از روش RT-PCR استفاده شد. در ابتدا با استفاده از کیت استخراج RNA (Qiagen) کل RNA سلول استخراج شد. یک میکرو گرم از RNA استخراج شده با استفاده از کیت Revert AidTM H-Minus First Strand cDNA synthesis (Fermentase) و پرایمرهای primer و Oligo primer (Fermentase) نسخه برداری معکوس شد. از نمونه ی کنترل منفی نیز استخراج RNA به عمل آمد. سپس از cDNA تولید شده به عنوان الگو برای انجام PCR استفاده شد. توالی پرایمرهای مورد نیاز در این مطالعه با مشخصات زیر استفاده شد:

Pdx-IF: 5'-CCT-TCC-CGT-GGA-TGA-AAT-CC-3'
Pdx-IR: 5'-GTC-AAG-TTC-AAC-ATC-ACT-GCC-3'

محصول PCR روی ژل آگارز ۱٪ منتقل و با

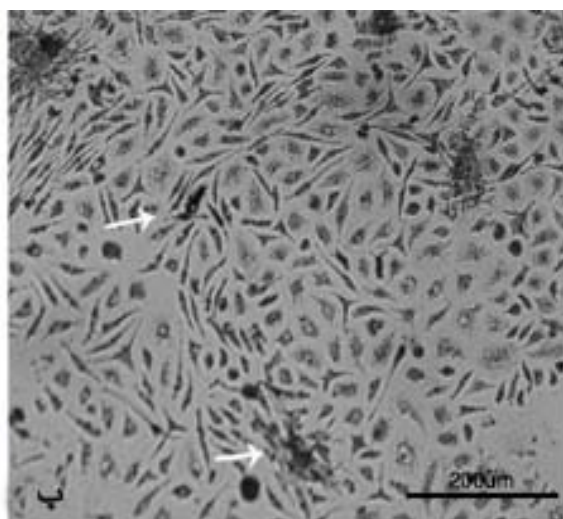
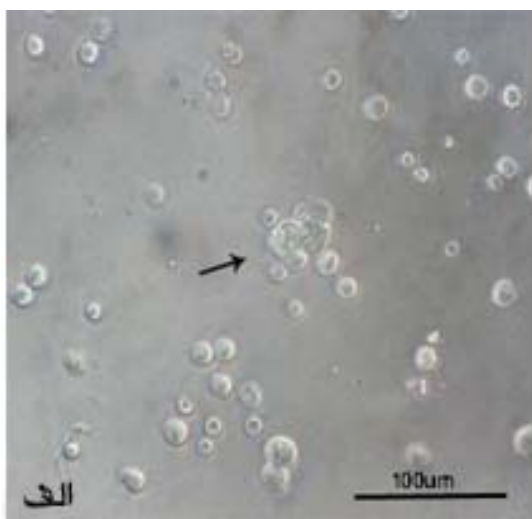
اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد. به منظور اطمینان از صحت RNA استخراج شده و همچنین درستی مراحل انجام کار از ژن خانگی b2M (House Keeping) به عنوان کنترل داخلی استفاده شد.

یافته ها:

سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان از

موش نر بالغ نژاد balb/c به دست آمد. این سلول ها

دارای خاصیت چسبندگی به ظروف پلاستیکی و توانایی تشکیل کلونی در شرایط آزمایشگاهی هستند (تصویر شماره ۱). در ابتدای استخراج، این سلول ها کروی شکل بوده و بعد از گذشت یک هفته به شکل دوکی و کشیده در آمدند. شکل ظاهری این سلول ها مشابه سلول های فیروبلست است (تصویر شماره ۱). با این تفاوت که سلول های فیروبلست قابلیت تحمل پاساژهای متوالی و نیز توانایی تمایز به دودمان های مختلف سلولی را ندارند.



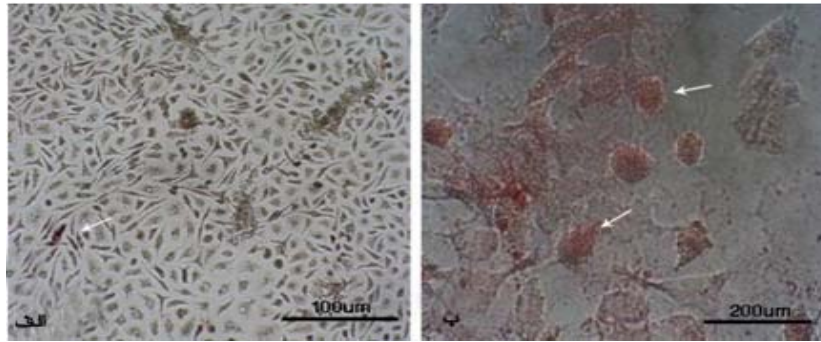
تصویر شماره ۱: سلول های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان موش

الف) بلافاصله پس از استخراج در روز اول سلول ها حالت کروی داشته و به همراه انواع دیگر سلول ها مانند رده سلول های خونی به صورت پراکنده و معلق دیده می شوند. ب) سلول های بنیادی استخراج شده با تراکم بالاتر چهارده روز بعد از کشت. این سلول ها تشکیل کلونی داده و مورفولوژی شبیه سلول های فیروبلست پیدا می کنند. پیکان به کلونی های تشکیل شده اشاره دارد.

پانکراس است (تصویر شماره ۲). سلول های بنیادی مزانشیمی در حالت آزمایشگاهی قادر به تمایز خود به خود به سلول های انسولین ساز بودند. آزمون آماری مجذور کای نشان داد که از نظر فراوانی نسبی تعداد سلول های تمایز یافته (قرمز) تفاوت معنی داری بین میانگین دو گروه کنترل ($8/7 \pm 15/8$) و تیمار ($7/8 \pm 74/2$) وجود دارد. به این ترتیب که در گروه تیمار تعداد سلول های قرمز به طور معنی داری بیشتر است ($P < 0/05$).

سلول های حاصل از تمایز با عصاره پانکراس تحت

رنگ آمیزی اختصاصی دیتیزون قرار گرفتند. سلول های انسولین ساز مشتق از سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان با استفاده از رنگ آمیزی دیتیزون به رنگ قرمز در آمدند (تصویر شماره ۲). در گروه کنترل منفی یعنی سلول هایی که با عصاره ی پانکراس تیمار نشده بودند، نیز تعداد معدودی سلول قرمز وجود داشت که نشان دهنده ی تمایز خود به خودی تعدادی از سلول ها به سلول های بتای

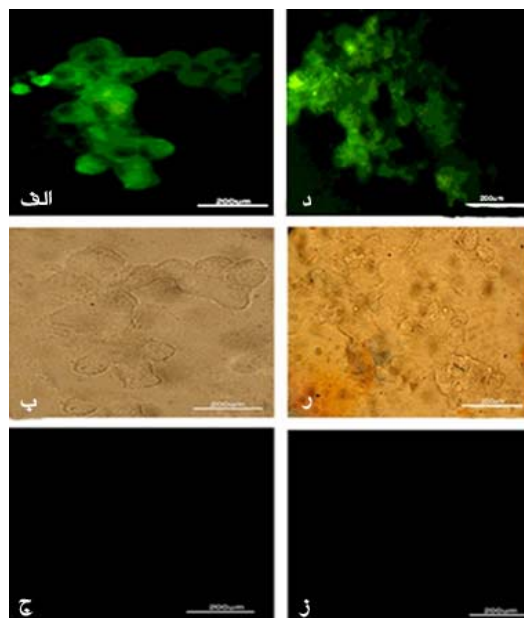


تصویر شماره ۲: تصویر میکروسکوپ نوری از سلول های رنگ آمیزی شده با رنگ اختصاصی دیتیزون

الف) در گروه کنترل منفی یعنی سلول های بنیادی مزانشیمی که در معرض عصاره پانکراس قرار نگرفته اند و دچار تمایز خود به خودی شده اند تعداد کمی سلول دیتیزون مثبت به صورت پراکنده وجود دارد. ب) سلول های قرمز رنگ یا سلول های دیتیزون مثبت نشان دهنده ی سلول های تمایز یافته حاصل از سلول های بنیادی مزانشیمی است که تحت اثر القایی عصاره پانکراس قرار گرفته اند. پیکان به سلول های تمایز یافته اشاره دارد.

جداگانه مورد استفاده قرار گرفت. سلول های انسولین ساز حاصل از اثر عصاره ی پانکراس قادر به بیان پروتئین انسولین - پرو انسولین و رسپتور بتای انسولین بودند (تصویر شماره ۳).

در روش ایمنو فلورسنس به منظور بررسی بیان فاکتورهای اختصاصی سلول های تولید کننده ی انسولین آنتی بادی های اولیه ضد نشانگر انسولین - پرو انسولین و ضد نشانگر رسپتور بتای انسولین به طور



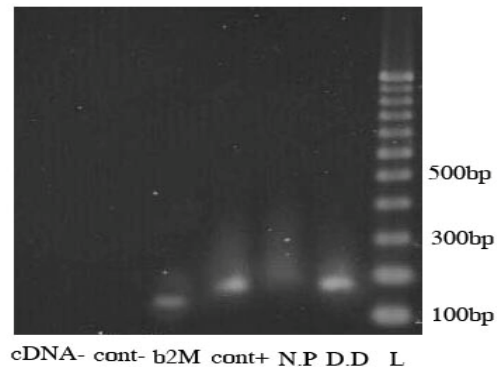
تصویر شماره ۳: بررسی بیان نشانگرهای اختصاصی سلول های انسولین ساز در سلول های حاصل از تمایز به روش ایمنو فلورسنس

الف) تصویر میکروسکوپ فلورسنس از سلول های تمایز یافته که بیان انسولین - پروانسولین، نشانگر ویژه سلول های بتای پانکراس را در این سلول ها نشان می دهد. ب) تصویر میکروسکوپی سلول های تمایز یافته از همان میدان دید با نور مرئی. د) تصویر میکروسکوپی فلورسنس از سلول های تمایز یافته که بیان گیرنده بتای انسولین، نشانگر ویژه سلول های بتای پانکراس را در این سلول ها نشان می دهد. ر) تصویر میکروسکوپی سلول های تمایز یافته از همان میدان دید با نور مرئی. ج و ز) نمونه های کنترل منفی که در آن ها آنتی بادی اولیه افزوده نشده است.

مغز استخوان به سلول های انسولین ساز می شود. سلول های انسولین ساز حاصل از تمایز قادر به بیان نشانگرهای اختصاصی انسولین - پروانسولین و رسپتور بتای انسولین بودند. همچنین این سلول ها ژن pdx-I را بیان نمودند.

تحقیقات نشان داده است، تزریق عصاره پانکراس به حیوان دیابتی باعث کاهش موقت قند خون و کاهش ترشح قند در ادرار می شود (۹). عصاره ی پانکراس به علت داشتن آنزیم های گوارشی اثرات مخربی را در برداشت ولی با حذف آنزیم های گوارش و اضافه کردن آن به رژیم غذایی انسان میزان قند خون در ادرار را کاهش می داد (۹). تکوین سلول های بتا به مسیرهای پیام رسانی، فاکتورهای رونویسی تنظیم کننده ی تمایز سلول و فاکتورهای ترشح شده از بافت های اطراف نیاز دارد (۱۰). چندین فاکتور ترشحي طی مراحل اولیه ی تکوین پانکراس ترشح می شود. از جمله این فاکتورها می توان *fgf*، اکتیوین A و رتینوئیک اسید را نام برد (۱۱). مطالعات پژوهشی نشان می دهد که با افزایش غلظت اکتیوین A باعث القای بیان ژن های *pdx-I*، انسولین و گلوکاگون می شود. این فعال سازی به علت اثر مستقیم اکتیوین A در تحریک تمایز سلول های مزانشیمی پانکراس است (۱۲). رتینوئیک اسید برای القای بیان ژن *pdx-I* در جوانه های آندودرمی پانکراس کافی می باشد (۱۳). مطالعات نشان می دهد که تکوین پانکراس شامل بر هم کنش های سلولی است و این بر هم کنش ها بین سلول های در حال تکوین و بافت مزانشیم اطراف آن ها است. از آنجایی که تکوین پانکراس موش تا دو هفته اول بعد از تولد کامل نمی شود، احتمالاً قادر به تولید فاکتورهای لازم برای تمایز سلول های بتا در شرایط آزمایشگاهی است. از جمله این فاکتورها می توان به فاکتور شبه انسولین II و فاکتور رشد عصب اشاره کرد (۱۴). نتایج پژوهش حاضر به خوبی نشان می دهد که عصاره ی پانکراس احتمالاً به دلیل دارا بودن چنین فاکتورهایی

برای بررسی بیان ژن *pdx-I*، RNA سلول های تمایز یافته به روش مستقیم (Direct Differentiation)، و روش نستین مثبت (Nestin Positive)، سلول های تمایز نیافته به عنوان نمونه ی کنترل منفی و بافت پانکراس به عنوان نمونه ی کنترل مثبت استخراج و به cDNA تبدیل شد. در نهایت محصول PCR روی ژل آگاروز برده شد. نتایج نشان داد که عصاره ی پانکراس توانست باعث القای بیان ژن *pdx-I* در سلول های تمایز یافته شود. در مورد بیان ژن *pdx-I* در سلول های بنیادی مزانشیمی باندی مشاهده نشد. بنابراین سلول های مذکور ژن *pdx-I* را بیان نکردند. (تصویر شماره ۴).



تصویر شماره ۳: بررسی بیان ژن *pdx-I* در سلول های

تمایز یافته به روش RT-PCR

(*Ladder D.D*: سلول های تمایز یافته به روش مستقیم؛ *N.P*: سلول های تمایز یافته با روش انتخاب سلول های نستین مثبت؛ *cont+* بافت پانکراس، *b2M* کنترل داخلی؛ *cont-* کنترل منفی و *cDNA-* بدون PCR؛ *Pdx-I*: *b2M*: 98 bp ؛198 bp

بحث:

در این پژوهش پانکراس نوزاد یک هفته ای موش کوچک آزمایشگاهی به طور کامل جداسازی شد و عصاره ی پانکراس به عنوان عامل القایی استفاده شد. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که عصاره ی پانکراس باعث القای تمایز سلول های بنیادی مزانشیم

می تواند باعث القای تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به سلول های تولید کننده ی انسولین شود. سلول های تمایز یافته فاکتور رونویسی pdx-I را بیان می کنند (۱۷). فاکتور رونویسی pdx-I برای ادامه روند تحریک و ترشح سلول ها بسیار مهم است. احتمالاً مکانیسم تمایزی در سلول های پانکراس را تنظیم می کند و در طی تکامل حفظ شده است (۷). در این پژوهش القای فنوتیپ سلول های انسولین ساز در غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره پانکراس انجام شد. غلظت مذکور علاوه بر بیان ژن فاکتور رونویسی pdx-I باعث بیان انسولین - پرو انسولین و رسپتور بتای انسولین در این سلول ها شده است.

Choi و همکارانش عصاره پانکراس موش صحرایی بالغ را روی تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی به منظور بررسی تمایز سلول های انسولین ساز استفاده کردند (۱۷). آن ها با استفاده از رنگ آمیزی دیتیزون سلول های تمایز یافته و تمایز نیافته را از هم تمیز دادند (۱۷).

Kim و همکارانش نیز با استفاده از شمارش سلول های تمایز یافته و تمایز نیافته میزان اثر غلظت این فاکتور تمایزی را بررسی کردند (۸). در این پژوهش به بررسی بیان پروتئین نستین در سلول های مزانشیمی مغز استخوان در جهت تمایز به سلول های انسولین ساز استفاده شد. نستین پروتئین حد واسط رشته ای است که به عنوان نشانگر سلول های نروایی تلیال شناخته شده است. این پروتئین به طور موقتی در مراحل اولیه ی تکوین بافت های متنوع بیان می شود. مطالعات اخیر پیشنهاد کرده اند که نستین می تواند نشانگر عمومی در سلول های بنیادی هم برای سلول های عصبی و هم برای سلول های اندودرمی و جزایر پانکراس باشد (۸). اگر نستین در سلول های بنیادی جنینی مهار شود باعث کاهش فاکتورهای رونویسی مرتبط با اندودرم و پانکراس و هورمون های پانکراسی و منجر به فقدان سلول های بتا در پانکراس می شود. درست است که

نستین به عنوان یک فاکتور عصبی است؛ ولی نبود آن در تکوین بافت های آندودرمی نقص هایی ایجاد می کند (۱۵). بر طبق این مطالعات با تمایز سلول های بنیادی مغز استخوان به سلول های نستین آن ها در جهت تمایز به سلول های انسولین ساز متمایز شدند. در واقع هدف از بیان سلول های نستین مثبت از سلول های بنیادی مزانشیم به دست آوردن سلول های اولیه و تا حدی تمایز یافته در جهت تمایز به سلول های انسولین ساز است. این روش بر طبق پروتکل پنج مرحله ای محققى به نام لوملسکی انجام شد که با استفاده از این روش تمایز سلول های نستین ساز به سلول های تولید کننده ی انسولین مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۹).

Milanesi و همکارانش در تحقیقی از محیط کشت پایه بدون سرم برای انتخاب سلول های نستین مثبت از بین سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان استفاده کردند (۱۵). با استفاده از یک پروتکل چند مرحله ای و اضافه کردن نیکوتین آمید سلول های نستین مثبت انتخاب شده از سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان را به سمت سلول های بتا تمایز دادند (۱۵).

در پژوهش حاضر مورفولوژی سلول های انسولین ساز مشتق شده از سلول های بنیادی مزانشیمی تحت اثر عامل القاگر عصاره ی پانکراس نوزاد یک هفته ای موش کوچک آزمایشگاهی به وسیله ی رنگ آمیزی دیتیزون به اثبات رسید. روی فلزی است که در سلول های بتای پانکراس بیشتر از هر بافت دیگری در بدن یافت می شود. این فلز که سوبسترای رنگ دیتیزون است بر روی گیرنده های سلولی بتای پانکراس قرار دارد (۱۶). مدت پایداری اتصال فلز روی و دیتیزون در محیط آزمایشگاهی چهار ساعت بیشتر نیست. رنگ آمیزی دیتیزون به صورت انتخابی باعث قرمز رنگ شدن سلول های بتای پانکراس می شود. در واقع در این روش برای پی بردن به وجود سلول های انسولین ساز وجود فلز روی به عنوان یکی از معیارهای

کردند (۲۰). Zhao و همکارانش با روش ایمنو سیتو شیمی وجود pdx-I و Nkx-I و نشانگرهای خاص سلول های بتای تمایز یافته میمون را ارزیابی کردند (۲۱). Myazaki و همکارانش توانستند C-peptide و pdx-I را در سلول های تمایز یافته بنیادی جنینی با روش ایمنو سیتو شیمی ردیابی کردند. آن ها این سلول ها را در جهت القای تمایز به سمت سلول های ترشح کننده ی انسولین سوق دادند. میزان بیان C-peptide در این سلول ها به طور چشمگیری افزایش یافته بود (۵). Nadya و همکارانش با ایجاد سلول های نستین مثبت در مسیر تمایز به سلول های انسولین ساز از سلول های بنیادی با استفاده از تکنیک RT-PCR وجود ژن pdx-I در سلول های انسولین ساز حاصل شناسایی کردند (۲۲).

نتیجه گیری:

با توجه به اثر عصاره پانکراس بر بیان ژن pdx-I و عملکرد این ژن در تولید انسولین در سلول های بتای پانکراس می تواند شرایطی را در محیط آزمایشگاهی فراهم کند که به وسیله ی آن فاکتورهای دیگری که همراه فاکتور pdx-I برای ترشح انسولین همکاری می کنند را مورد مطالعه قرار داد. علاوه بر آن می توان فاکتورهای دیگری که در عصاره ی پانکراس وجود دارد را جداسازی کرد و تأثیر هر کدام از آن ها را بر تمایز سلول های انسولین ساز به صورت جداگانه ای مورد بررسی قرار داد. بنابراین پیشنهاد می شود که برای بررسی عملکرد سلول های تمایز یافته و استفاده آن ها در کارهای درمانی، این سلول ها به حیوانات مدل دیابتی پیوند و بعد از آن طبیعی شدن میزان قند خون و بهبود بیماری را در این حیوانات مطالعه کرد.

تشکر و قدردانی:

این پژوهش در قالب طرح تحقیقاتی و با حمایت مالی پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه شهرکرد انجام شده است. بدینوسیله از تمام کسانی که ما را در انجام این طرح یاری نمودند قدردانی می شود.

مناسب در نظر گرفته شده است (۱۶). Choi و همکارانش رنگ آمیزی دیتیزون را چند بار تکرار کردند. در سلول هایی که با غلظت ۵۰ میکرو گرم بر میلی لیتر عصاره تیمار شده بودند تعداد سلول های قرمز رنگ اندکی دیده می شد (۱۷) به ترتیب هر چه بر میزان عصاره افزوده شد تعداد سلول های قرمز رنگ بیشتری دیده شد. آن ها مشاهده کردند که در غلظت ۲۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر تعداد سلول های قرمز رنگ بیشتر بوده و دسته جات سلولی کامل تری نسبت به سلول های گروه منفی مشاهده می شود (۱۷).

pdx-I یکی از ژن های عمده و مهم در تکوین پانکراس است. بررسی RT-PCR نشان داد که رونوشت ژن pdx-I تنها در سلول هایی که به روش تمایز مستقیم تمایز یافته بودند به صورت واضح دیده شد. رونوشت ژن در سلول های تمایز یافته به روش انتخاب سلول های نستین مثبت بسیار اندک بود. بیان ژن pdx-I در سلول های گروه منفی که تحت تیمار قرار نگرفته بودند دیده نشد.

Choi و همکارانش نشان دادند که سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان تیمار شده با عصاره ی پانکراس موش صحرایی توانایی بیان ژن های خاص تکوین سلول های بتا مانند pdx-I را دارند (۱۷). احتمالاً در پژوهش حاضر عصاره ی پانکراس استخراج شده از موش کوچک آزمایشگاهی اثر تحریکی بر القای بیان ژن pdx-I داشته است. در این سلول ها ژن pdx-I متعاقباً مسیر تمایزی به سمت سلول های انسولین ساز را پیش برده است. Limbert و همکارانش با القای افزایش بیان pdx-I در سلول های بنیادی مزانشیم باعث تمایز این سلول ها به سمت سلول های تولید کننده ی انسولین شدند (۱۸).

Yong و همکارانش نیز با ایجاد سلول های نستین مثبت در مسیر تمایز سلول های انسولین ساز از سلول های بنیادی و استفاده از تکنیک RT-PCR وجود ژن pdx-I در سلول های انسولین ساز حاصل را شناسایی

منابع:

1. Ren J, Jin P, Wang E, Liu E, Harlan DM, Li X, et al. Pancreatic islet cell therapy for type I diabetes: understanding the effects of glucose stimulation on islets in order to produce better islets for transplantation. *J Transl Med*. 2007; 5: 1.
2. Tang DQ, Cao LZ, Burkhardt BR, Xia CQ, Litherland SA, Atkinson MA, et al. In vivo and in vitro characterization of insulin-producing cells obtained from murine bone marrow. *Diabetes*. 2004 Jul; 53(7): 1721-32.
3. Mishra PJ, Mishra PJ, Glod JW, Banerjee D. Mesenchymal stem cells: flip side of the coin. *Cancer Res*. 2009 Feb 15; 69(4): 1255-8.
4. Xie QP, Huang H, Xu B, Dong X, Gao SL, Zhang B, et al. Human bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into insulin-producing cells upon micro environmental manipulation in vitro. *Differentiation*. 2009 Jun; 77(5): 483-91.
5. Miyazaki S, Yamato E, Miyazaki J. Regulated expression of pdx-1 promotes in vitro differentiation of insulin-producing cells from embryonic stem cells. *Diabetes*. 2004 Apr; 53(4): 1030-7.
6. Vaca P, Martin F, Vegara-Meseguer JM, Rovira JM, Berna G, Soria B. Induction of differentiation of embryonic stem cells into insulin-secreting cells by fetal soluble factors. *Stem cells*. 2006 Feb; 24(2): 258-65.
7. Jacquemin P, Yoshitomi H, Kashima Y, Rousseau GG, Lemaigre FP, Zaret KS. An endothelial-mesenchymal relay pathway regulates early phases of pancreas development. *Dev Biol*. 2006 Feb 1; 290(1): 189-99.
8. Kim YS, Lee JJ, Shin JS, Kim HJ, Kim CW. Enhancement of mouse pancreatic regeneration and HIT-T15 cell proliferation with rat pancreatic extract. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Sep 26; 309(3): 528-32.
9. Banting FG, Best CH, Collip JB, Campbell WR, Fletcher AA. Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus: preliminary report. 1922. *CMAJ*. 1991 Nov 15; 145(10): 1281-6.
10. Wessells NK, Cohen JH. Early Pancreas organogenesis: morphogenesis, tissue interactions, and mass effects. *Dev Biol*. 1967 Mar; 15(3): 237-70.
11. Vicente-Salar N, Santana A, Reig JA, Roche E. Differentiation of embryonic stem cells using pancreatic bud-conditioned medium gives rise to neuroectoderm-derived insulin-secreting cells. *Cell Reprogram*. 2011 Feb; 13(1): 77-84.
12. Wiles MV, Johansson BM. Embryonic stem cell development in a chemically defined medium. *Exp Cell Res*. 1999 Feb 25; 247(1): 241-8.
13. Kawahira H, Ma NH, Tzanakakis ES, McMahon AP, Chuang PT, Hebrok M. Combined activities of hedgehog signaling inhibitors regulate pancreas development. *Development*. 2003 Oct; 130(20): 4871-9.
14. Domenech M, Yu H, Warrick J, Badders NM, Meyvantsson I, Alexander CM, et al. Cellular observations enabled by microculture: paracrine signaling and population demographics. *Integr Biol (Camb)*. 2009 Mar; 1(3): 267-74.
15. Milanesi A, Lee JW, Xu Q, Perin L, Yu JS. Differentiation of nest in-positive cells derived from bone marrow into pancreatic endocrine and ductal cells in vitro. *J Endocrinol*. 2011 May; 209(2): 193-201.
16. Dong QY, Chen L, Gao GQ, Wang L, Song J, Chen B, et al. Allogeneic diabetic mesenchymal stem cells transplantation in streptozotocin-induced diabetic rat. *Clin Invest Med*. 2008; 31(6): E328-37.
17. Choi KS, Shin JS, Lee JJ, Kim YS, Kim SB, Kim CW. In vitro trans-differentiation of rat mesenchymal cells into insulin-producing cells by rat pancreatic extract. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 May 20; 330(4): 1299-305.
18. Limbert C, Path G, Ebert R, Rothhammer V, Kassem M, Jakob F, et al. PDX1- and NGN3-mediated in vitro reprogramming of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells into pancreatic endocrine lineages. *Cytherapy*. 2011 Aug; 13(7): 802-13.
19. Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, Velasco I, Ravin R, McKay R. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science*. 2001 May 18; 292(5520): 1389-94.

20. Huang YC, Yang ZM, Chen XH, Tan MY, Wang J, Li XQ, et al. Isolation of mesenchymal stem cells from human placental decidua basalis and resistance to hypoxia and serum deprivation. *Stem Cell Rev.* 2009 Sep; 5(3): 247-55.
21. Zhao Y, Jiang Z, Zhao T, Ye M, Hu C, Yin Z, et al. Reversal of type 1 diabetes via islet beta cell regeneration following immune modulation by cord blood-derived multipotent stem cells. *BMC Med.* 2012; 10: 3.
22. Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, Velasco I, Ravin R, McKay R. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science.* 2001 May 18; 292(5520): 1389-94.
23. Mansouri-Bidekani A, Esmaili F, Houshmand F, Hajisharifi Z. Evaluation of pdx-1 gene expression in insulin producing cells, derived from embryonal carcinoma stem cells. *J Shahrekord Univ Med Sci.* 2013; 15 (1): 91-102

Effect of pancreatic extract on insulin secreting cell differentiation from mouse bone marrow mesenchymal stem cells

Hatamnia Z^{1*}, Esmaeli F¹, Houshmand F², Dehdehi L¹

¹Biology Dept., Shahrekord University, Shahrekord, I.R. Iran; ²Physiology Dept., Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran.

Received: 12/May/2013

Accepted: 20/Oct/2013

Background and aims: Diabetes type 1 is developed as a result of autoimmune destruction of pancreatic islet beta cells. Recent studies indicated that many types of stem cells could be considered as potential sources of obtaining Insulin like producing cells (IPCS). In this study, the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into insulin-producing cells was investigated using mouse pancreatic extract.

Methods: In this laboratory experimental study, bone marrow mesenchymal stem cells were used to differentiate into insulin-producing cells. The differentiated cells were assessed using dithizone-specific staining and anti-insulin-proinsulin and anti-insulin receptor beta antibodies. In addition, specific gene expression of pancreatic cells was assessed by RT-PCR method.

Results: The differentiated cells derived from direct method of morphology were represented as pancreatic beta cells. Positive dithizone cells were observed as red-purple bundles. The results of RT-PCR represented specific gene expression of beta cells in the differentiated cells as direct. Immunofluorescence confirmed the presence of beta cells specific markers in these cells.

Conclusion: The results of this study indicated that bone marrow mesenchymal stem cells could differentiate into insulin-producing cells in presence of pancreatic extract. Therefore, application of these results facilitates in vitro production of beta cells from stem cells.

Keywords: Bone marrow mesenchymal stem cells, Pancreatic extract, Differentiation, Insulin-producing cells, Pancreatic beta cells.

Cite this article as: Hatamnia Z, Esmaeli F, Houshmand F, Dehdehi L. Effect of pancreatic extract on insulin secreting cell differentiation from mouse bone marrow mesenchymal stem cells. J Shahrekord Univ Med Sci. 2014; 16(2): 52-62.

*Corresponding author:

Biology Dept., Shahrekord University, Shahrekord, I.R. Iran. Tel: 00989370757049,
E-mail: z.diantusi@yahoo.com